

nie można jeszcze w tej chwili całkowicie potwierdzić. Nie można również jeszcze odpowiedzieć na szereg pytań związanych z rozpoznawaniem stanów zapalnych metodą analizy immunoelektroforetycznej. Nie wiadomo np. jak będzie wyglądał obraz immunoelektroforetyczny śluzu przy stanach zapalnych poszczególnych odcinków układu rozrodczego.

W poprzedniej pracy przyjęto tezę, że cykliczne zmiany w obrazie immunoelektroforetycznym śluzu w ciągu cyklu płciowego są wynikiem oddziaływania hormonów płciowych na błonę śluzową i jej czynność wydzielniczą. Zanik precypitacji w śluzie rujowym, a tym samym brak białka surowiczego w tym okresie cyklu w śluzie wyjaśniono oddziaływaniem hormonów estrogennych na układy: kwas hialuronowy — hialuronidaza (1).

W obecnie opisywanych badaniach stwierdzono, że w stanach chorobowych w śluzie rujowym występuje wyraźnie znaczna domieszka białka, która manifestuje się liniami precypitacyjnymi w immunoelektroforogramie śluzu. Jeżeli taką precypitację stwierdzamy w przypadkach chorobowych potwierdzonych badaniem klinicznym sprawa nie wymaga specjalnej interpretacji, ponieważ zupełnie zrozumiałym faktem jest obecność białek surowiczych w przebiegu wyraźnie stwierdzonego procesu zapalnego. Natomiast obecność białka w śluzie w tych wypadkach, gdy klinicznie nie stwierdza się procesu zapalnego i można mieć jedynie podejrzenie co do jego obecności — wymaga odpowiedniego wyjaśnienia. Wyjaśnienie to dotyczy nie tyle udowodnienia istnienia stanu zapalnego, ponieważ zagadnienie to jest od dawna dyskutowane i w wielu wypadkach podejrzewa się jego występowanie. Brak było dotychczas odpowiednich metod pozwalających na jego rozpoznanie.

Wydaje się, że najbardziej istotną jest sprawa, na drodze jakich mechanizmów do takich stanów może dochodzić. Zagadnienie to będzie tematem dalszych szczegółowych badań, niemniej można przyjąć następującą tezę roboczą, która mogła by tłumaczyć obserwowane fakty: w tych wypadkach, gdy w okresie rujowym istnieje niedostateczny poziom hormonów estrogennych, wówczas nie dochodzi do prawidłowego unieczynnienia przez estrogeny hialuronidazy. Innymi słowy „uszczelnienie” błony śluzowej nie jest wówczas dostateczne i doprowadza do przenikania białek surowiczych do śluzu, również w okresie rujowym.

Teza ta ma swe uzasadnienie w badaniach wykonanych przez Michalika (5), który wykazał, że pod wpływem progesteronu zawartość białek surowiczych w śluzie ulega zwiększeniu.

W świetle tych danych, jak również na podstawie opisanych doświadczeń w niniejszej pracy (tab. 2) można przypuszczać, że jedną z przyczyn powodujących powstawanie stanów zapalnych macicy (*endometritis*) są stany niedoczynności układu dokrewnego, przebiegające z obniżonym poziomem estrogenów.

Senze i wsp., wykonując badania za pomocą testu krystalizacji śluzu, stwierdzili, że brak zacień występował w tych cyklach, które przebiegały ze słabą krystalizacją śluzu rujowego (7).

Wniosek taki znajduje również uzasadnienie w obserwacjach, jakie poczyniono w tych wypadkach, gdy podejmowano próby leczenia *endometritis* drogą domacicznego podawania estrogenów (3).

Z tym przypuszczeniem pokrywają się też własne obserwacje, ponieważ w badaniach, które przedstawiono w tab. 2 obserwowano zmiany w obrazach immunoelektroforetycznych śluzu zachodzące w kolejnych cyklach.

Przedstawione wnioski znajdują potwierdzenie w badaniach Ritznera (6). Autor ten wykonując biopsję macicy u 136 krów, u których występowała „niepłodność bezobjawowa”, w 61,8% stwierdził histologicznie stan zapalny.

Istotnymi spostrzeżeniami, jakie poczynił ten autor były te badania, które wykazały, że u 59,1% przypadków histologicznie potwierdzono stan zapalny, natomiast badaniem klinicznym stanów tych nie można było zdiagnozować.

Przytaczane tego rodzaju badania histologiczne są zbieżne z własnymi doświadczeniami, jakie przeprowadzono stosując metodę immunoelektroforezy.

Podsumowując powyższą dyskusję nad wynikami badań, należy podkreślić, że niniejsza praca ma na celu tylko wykazanie i udowodnienie występowania różnic, jakie obserwowano w badaniach immunoelektroforetycznych śluzu i wykazanie, że różnice te mogą być wykorzystane do celów diagnostycznych.

Wprowadzenie metody immunoelektroforetycznej dla diagnostyki i badań nad przyczynami niepłodności krów, wysuwa szereg problemów metodycznych oraz nowych zagadnień dotyczących etio-patogenezy samego procesu chorobowego. W niniejszej pracy tylko niektóre zagadnienia zostały poruszone i wymagają dalszego opracowania.

P i ś m i e n n i c t w o

1. Diczajusy E., Lauritzen Ch.: *Cestrogene beim Menschen* Springer Verlag, Berlin 1961.
2. Jaśkowski L., Rułski T.: Obserwacje nad wystąpieniem i przyczynami niepłodności w czterech oborach wielkostatnych wg danych w latach 1951—1960. Mat. VII Sesji Naukowej Sekcji Fizjologii i Patologii Rozrodu PTNW. Poznań 1964.
3. Koch W., Beck G., Heim E.: *Tierärztliche Umschau* 12, 401, 1958.
4. Michalik J.: Analiza immunoelektroforetyczna śluzu pobranego z okolicy szyjki macicznej krów. II — Obraz immunoelektroforetyczny śluzu w cyklu płciowym krów. (Praca w druku).
5. Michalik J.: Obraz immunoelektroforetyczny śluzu szyjkowego u krów. Praca dokt. 1964 nie publikowana.
6. Ritzner S.: Biopsja błony śluzowej macicy w rozpoznaniu zapalenia macicy ze szczególnym uwzględnieniem klinicznie trudnych do stwierdzenia postaci zapalenia macicy. Dys. dokt. Zagreb wg Vet. Archiv. 30, 277, 1960.
7. Senze A., Zembricki A.: *Med. Wet.* 18, 544, 1962.

Adres autora: doc. dr Jerzy Mazurczak, Warszawa, Al. Jerozolimskie 25/30

JERZY BRANNY, JAN PILCH, STEFAN WIERZBOWSKI

Zamrażanie nasienia tryków w niskich temperaturach II. Doświadczenia z rozcieńczalnikami

Zakład Fizjologii Rozrodu i Sztucznego Unasienniania Zwierząt Balice k/Krakowa
Kierownik: prof. dr WŁADYSŁAW BIELAŃSKI

Wprowadzone przez Folge'a i Rowsona (1952) długotrwałe konserwowanie nasienia buhajów w niskich temperaturach otworzyło nowe możliwości wykorzystania rozplodnika męskiego w hodowli. Dobre wyniki uzyskane przy użyciu konserwowanego w niskich temperatu-

rach nasienia buhajów, pozwoliły na wprowadzenie tej metody do praktyki sztucznego unasienniania bydła. Tymczasem, dotychczas podejmowane próby zamrażania nasienia tryków, wskazują na konieczność opracowania innych metod postępowania, niż stosowane w odniesie-

niu do nasienia buhajów *. Mimo dodatniej oceny nasienia po zamrożeniu, wyniki unasiwienia pozostają bowiem nadal jeszcze poniżej granicy wymaganej dla praktycznego zastosowania metody.

Wobec istotnego znaczenia dla hodowli owiec metody konserwacji nasienia w niskich temperaturach, podjęte zostały w 1963 r. w Instytucie Zootechniki badania nad konserwacją nasienia tryków w niskich temperaturach.

Zostały przeprowadzone trzy doświadczenia z zamrażaniem nasienia tryków w niskich temperaturach (płynny azot lub zestalony CO₂).

W pierwszym doświadczeniu badano możliwość użycia do rozcieńczania nasienia różnych rozcieńczalników.

W drugim doświadczeniu starano się określić wpływ temperatury w jakiej dodaje się glicerol do rozcieńczonego nasienia na ruchliwość plemników po odmrożeniu.

W trzecim doświadczeniu przeprowadzono próbę unasiwienia owiec nasieniem zamrożonym do temperatury — 79°.

Materiał i metody

Do doświadczenia użyto nasienia, pochodzącego od 8 tryków rasy merynos polski w wieku od 1,5 do 4 lat. Pobieranie, ocena i wstępne przygotowanie nasienia, przebiegało w kolejnych doświadczeniach według zmienionego układu. Po pobraniu na sztuczną pochwę, każdy ejakulat oceniano szacunkowo pod mikroskopem na stoliku Bloma i określano jego przydatność do zamrażania (minimum 80% plemników wykazujących ruch postępowy przy minimalnej gęstości szacunkowej SD). Po rozcieńczeniu w sposób poniżej opisany (doświadczenia I, II, III), nasienie było poddawane 18-godzinnej ekwilibracji w temperaturze +3°. Po ekwilibracji nasienie oceniano, a następnie poddawano procesowi zamrażania, stosując następujący schemat obniżania temperatury:

- od +3 do —15 — 1°/min.
- od —15 do —25 — 2°/min.
- od —25 do —76 — 5—10°/min.

Jako środka chłodzącego używano mieszaniny alkoholu i zestalonego CO₂. Po uzyskaniu temperatury —76°, w dwu pierwszych doświadczeniach nasienie przekładano do termosu z płynnym azotem (—196°).

I. W pierwszym doświadczeniu porównywano rozcieńczalnik żółtkowo-cytrynianowo-glukozowo-glicerolowy (ż. c. gl. g.) wg *Łopatki i Ostaszki* (1962) z rozcieńczalnikami mlekowo-żółtkowo-glukozowo-glicerolowym (m. ż. gl. g.). Skład rozcieńczalnika ż. c. gl. g.:

cytrynian sodu (dwuwodny)	3,5 g
glukoza	1,5 g
żółtko jaja kurzego	15,0 ml
woda destylowana	100 ml
glicerol	12,0 %

Skład rozcieńczalnika m. ż. gl. g.:

mleko	83,0 ml
żółtko jaja kurzego	10,0 ml
glukoza	1,5 g
glicerol	7,0 %

Po przeprowadzonej ocenie nasienia, każdy ejakulat dzielono na dwie równe części i rozcieńczano każdą z nich w stosunku 1 : 10 jednym z dwu podanych rozcieńczalników w temperaturze +32°. Po rozmrożeniu

*) Zagadnienia związane z technologią zamrażania nasienia tryków zostały ujęte w oddzielnym opracowaniu.

określano procent plemników wykazujących ruch postępowy oraz określano czas przeżywania plemników w temperaturze +46,5°, w następujących odstępach czasu od momentu po zamrożeniu: po 1 godzinie, po 24 godzinach i po 7 dniach. Ogółem przebadano w tym układzie 32 ejakulatory.

II. W dalszym doświadczeniu zajmowano się wpływem temperatury dodawania glicerolu. Podobnie jak w poprzednim, każdy ejakulat dzielono na dwie części (A i B). W stosunku do każdej postępowanie było odmienne.

Część A. Po rozcieńczeniu w stosunku 1 : 10, rozcieńczalnikiem ż. c. gl. g. w temperaturze +32°, nasienie ampułkowano. Następnie umieszczano w łaźni wodnej i schładzano do temperatury około +3°.

Część B. Po rozcieńczeniu w stosunku 1 : 5, rozcieńczalnikiem ż. c. gl. bez glicerolu, nasienie umieszczano w łaźni wodnej i schładzano w ciągu 2—3 godzin do temperatury około +3°. W tej temperaturze przeprowadzono ostateczne rozcieńczenie w stosunku 1 : 1, rozcieńczalnikiem zawierającym glicerol.

Po jednej i po 24 godzinach od ukończenia zamrażania, nasienie odmrażano w temperaturze +38° i oceniano pod mikroskopem procent plemników wykazujących ruch postępowy. Doświadczenie przeprowadzono na 12 ejakulatach.

III. W trzecim doświadczeniu przeprowadzono próbę inseminacji owiec nasieniem zamrożonym do temperatury —79°. Doświadczenie przeprowadzono w jednym z zakładów doświadczalnych IZ, używając nasienia tryków z tamtejszej owczarni. Nasienie po pobraniu i ocenie, rozcieńczano rozcieńczalnikiem żółtkowo-cytrynianowo-glukozowo-glicerolowym w takim stosunku, aby koncentracja żywych plemników w jednej dawce inseminacyjnej (0,2 ml) wynosiła około 200 milionów, przewidyując, że w trakcie zamrażania straty wyniosą około 50—60%. Ogółem unasiwiono 36 owiec, nasieniem pobranym od 5 tryków.

Do obliczeń statystycznych dwu pierwszych doświadczeń, zastosowano test „t” — Studenta.

Wyniki

W I doświadczeniu, przeprowadzonym w celu określenia przydatności dwóch różnych rozcieńczalników do rozcieńczania nasienia, przeznaczonych do zamrażania uzyskano wyniki przedstawione w tabeli 1.

Tab. 1. Porównanie ruchliwości i czasu przeżywania nasienia, rozcieńczonego dwoma rozcieńczalnikami, po zamrożeniu do —196°

Rozcieńczalnik	% plemników o ruchu post.				Czas przeżywania w temp. +66,5° w min.		
	po pobraniu	po mrożeniu			1 h	24 h	7 dn.
ż.c.gl.g.	76	39	37	27	39	33	25
m.ż.gl.g.	76	39	37	31	44	37	29

Różnice między wartościami w procencie plemników wykazujących ruch postępowy i w czasie przeżywania plemników w temperaturze +46,5°, dla obu badanych rozcieńczalników, określone testem „t” Studenta były nieistotne statystycznie.

W II. doświadczeniu, nad określeniem wpływu temperatury dodawania glicerolu do nasienia nie stwierdzono, przy pomocy testu t Studenta istotnych statystycznie różnic. Ruchli-

wość plemników w nasieniu rozcieńczonym rozcieńczalnikiem zawierającym glicerol w $+32^{\circ}$ wynosiła średnio 41% plemników o ruchu postępowym, podczas gdy w nasieniu, do którego dodawano glicerol w rozcieńczalniku w temperaturze $+3^{\circ}$ wynosiła 35%.

W III. doświadczeniu, obejmującym unasielenie owiec nasieniem zamrożonym w rozcieńczalniku ż. c. gl. g. z 12% dodatkiem glicerolu i przechowywanym przez okres około 14 dni w temperaturze -79° , uzyskano rezultaty przedstawione w tabeli 2.

Tab. 2. Wyniki unasielenia owiec nasieniem mrożonym

L. p.	Nr tryka	Ruchliwość po pobraniu	Ruchliwość po mrożeniu	Owiec		
				unas.	zakoc.	procent
1	213	5/80	20 — 30	14	1	7,1
2	1671	5/90	20 — 30	7	1	14,2
3	877	4/80	20 — 30	6	0	0
4	1827	5/90	20 — 30	5	1	20,0
5	1611	4/90	20 — 30	4	1	25,0

Na 36 zainseminowanych doszyjkowo, w czasie pierwszej rui owiec wykociło się 11%.

Dyskusja

Wyniki oceny laboratoryjnej nasienia zamrożonego, jakie uzyskano w efekcie przeprowadzonych prac porównawczych nad rozcieńczalnikami i sposobem dodawania glicerolu, nie odbiegają od podawanych w literaturze.

Znaczne rozbieżności w wynikach zakoczeń, jakie uzyskiwano przy stosowaniu nasienia zamrożonego, wskazują na niedoskonałość metody, względnie niedostateczne jeszcze opano-

wanie techniki postępowania. Uzyskane przez nas wyniki (11% zakończonych maciorek) są zbliżone do podawanych przez Emmensa i wsp. — 5% (1955), Łoginowej i Łopyrina — 16—18% (1965). Odbiegają natomiast znacznie od podawanych przez Mackepladze i wsp. — 66,2% (1960), Łoginową — 58% (1959), Łoginową — 38% (1962), Łopatkę — 52,3% (1962), Łopatkę i Ostaszkę — 67% (1962), Morozowa — 40,1% (1959), Pokatilową — 41,1% (1960).

Istotną trudność w opanowaniu metody zamrażania nasienia tryków stanowi dotychczas brak próby laboratoryjnej oceny nasienia, która mówiłaby o płodności nasienia. Podobne obserwacje poczyniono również przy postępowaniu się nasieniem płynnym, gdzie ocena laboratoryjna tylko w ograniczonym zakresie mówi o przydatności nasienia do unasielenia. Badania nad znalezieniem wykładnika jakości nasienia tryków, który byłby wskaźnikiem płodności, zostały skierowane na tor badań nad zawartością fruktozy, indeksu fruktolizy, aktywności enzymów, jak dehydrogenazy i cytochromoksydazy (Ten-Jen-Bon, 1965).

Wnioski

1. Na podstawie przeprowadzonych obserwacji stwierdzono, że dodawanie glicerolu w temperaturze $+32^{\circ}$ nie wpływa na ruchliwość po odmrożeniu, co stanowi istotne uproszczenie metodyczne.

2. Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w ocenie ruchliwości i w przeżywaniu nasienia tryków, rozcieńzonego rozcieńczalnikami: żółtkowo-cytrynianowo-glukozowo-glicerolowym i mlekowo-żółtkowo-glukozowo-glicerolowym.

Adres autora: Jerzy Branny, Kraków, ul. Białoprądnicka 4b

MIECZYŚLAW LEWANDOWSKI

Prosty sposób ułatwiający rozpoznanie i rokowanie w przypadkach niektórych kulawizn u bydła

Katedra Chirurgii Wydziału Weterynaryjnego WSR w Lublinie
KIEROWNIK: prof. dr MIECZYŚLAW LEWANDOWSKI

Przeżuwacze mają kończynę opierającą się dwoma palcami o podłoże. Palce są obciążone dźwiganiem ciężaru ciała niemal w równym stopniu; palec przysrodkowy nieco więcej. W przypadku zmian patologicznych, wywołujących ból, umiejscowionych nawet w jednym palcu, występuje niepełne obciążenie kończyny i kulawizna. Zmiany mogą być różne, uchwytnie wzrokiem, lub niczym nie zaznaczające się na zewnątrz. Znalezienie ich jest nierzadko trudne. Reguły stosowane przy badaniu koni często u bydła zawodzą. Kulawizna, mająca za przyczynę stany patologiczne w palcach, może objawiać się u krowy nie tylko zmniejs-

zeniem stopnia i czasu obciążania kończyny, ale też wykroku.

Ustalenie czy i jaki palec jest chory daje się u bydła czasem przeprowadzić przy obserwowaniu zwierzęcia w ruchu. Odwodzi ono lub przywodzi kończynę, kiedy chce odciążać palec zmieniony patologicznie. Takie odwodzenie może jednak mieć za przyczynę zmiany w górnych odcinkach kończyny. Objaw nie jest przez to dostatecznie pewny.

Określenie miejsca, gdzie znajduje się przyczyna upośledzająca czynność kończyny przez uciskanie palcami czy też kleszczami, jest u bydła najczęściej mało wartościowe przy stałej tendencji do wyrwania podniesionej koń-